

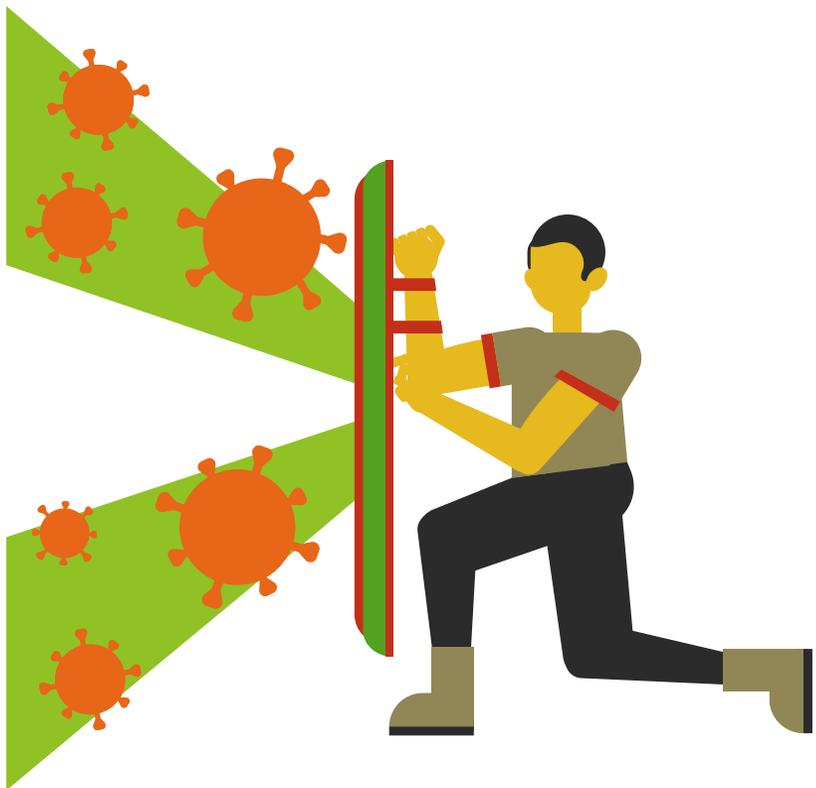
Antimicrobico-resistenza, cure e
ambiente Firenze 19/06/2024

Uso delle piante officinali leri, oggi, domani

Dott.ssa Giuliana Donadio



«L'antimicrobicoresistenza è il fenomeno per cui un farmaco antimicrobico perde la sua efficacia nel trattare le infezioni causate da microorganismi che originariamente era in grado di eliminare».



Come combattere la
resistenza
antibiotica??

Responsabile

Razionale



Appropriato

Consapevole

► **Uso PRUDENTE** degli antibiotici
in ambito umano e veterinario



Sorveglianza e
monitoraggio



Prevenzione



Promozione dell'uso
di antibiotici



Nuove fonti di antibiotici: Le Piante

Un pò di storia

1

Preistoria

In alcuni insediamenti preistorici si sono rinvenuti i semi di *Sambucus nigra* e di *Sambucus ebulus*, che venivano utilizzati dall'uomo primitivo come medicinali

2

Antichi testi indiani

la Farmacologia nacque in India, nelle rigogliose foreste delle rive del Gange, come parte integrante della medicina AYURVEDICA.

3

2000 a.c.Cina

L'imperatore cinese Shen Nung esaminò molte erbe, radici, ricavate da paludi e boschi, che ancora oggi fanno parte della medicina tradizionale cinese

4

Egizi

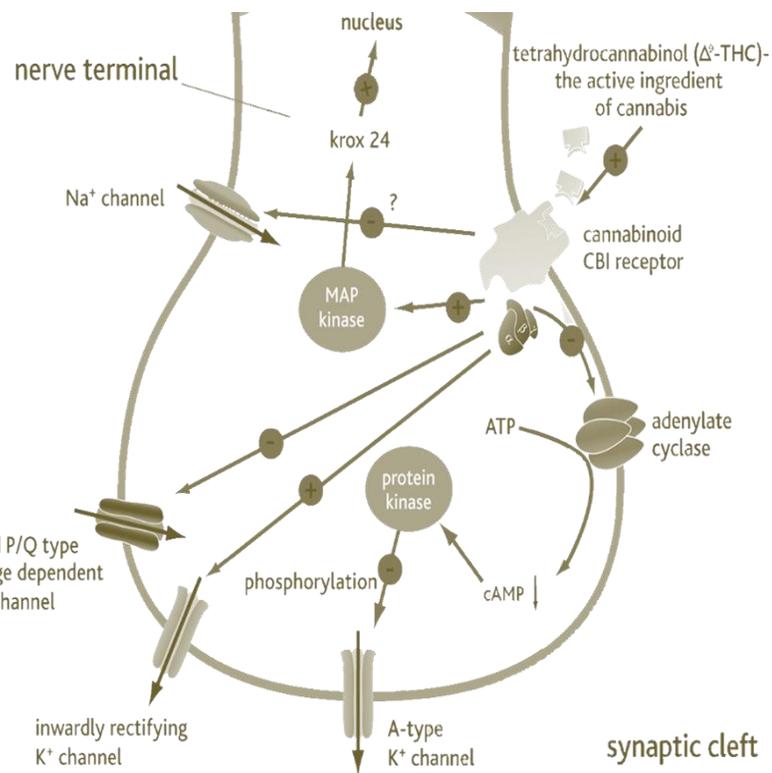
Reperti archeologici documentano, l'uso della scilla, della camomilla, del rosmarino e come antidoto per veleni.

Che cos'è una pianta medicinale?

► E' Pianta Medicinale ogni organismo vegetale che contiene in uno o più dei suoi organi, sostanze che possono essere utilizzate a fini terapeutici o preventivi o che sono i precursori di emisintesi chemiofarmaceutiche (OMS - Organizzazione Mondiale della Sanità)



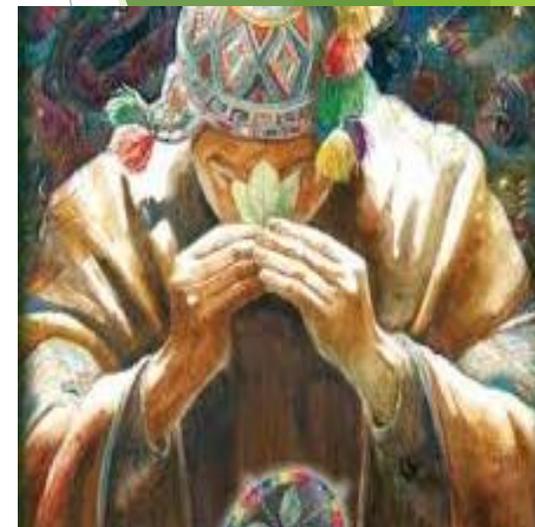
Le molecole naturali giocano un ruolo importante nel processo di drug discovery



L'attività dei composti naturali è attribuita a interazioni farmaco-target (Meccanismo d'azione)

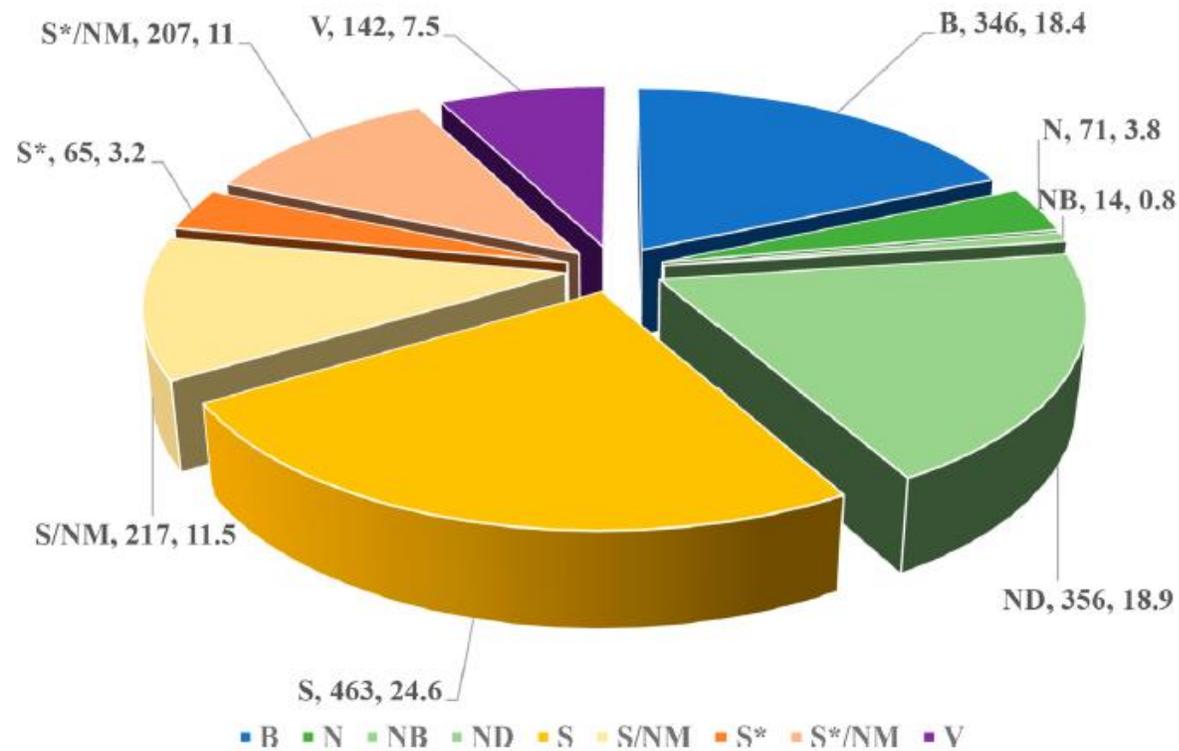
I componenti degli estratti vegetali sono responsabili dell'attività biologica non un mistico "potere"

Nuove tecnologie hanno consentito di caratterizzare le strutture delle molecole



Nuova era in fitochimica e farmacologia

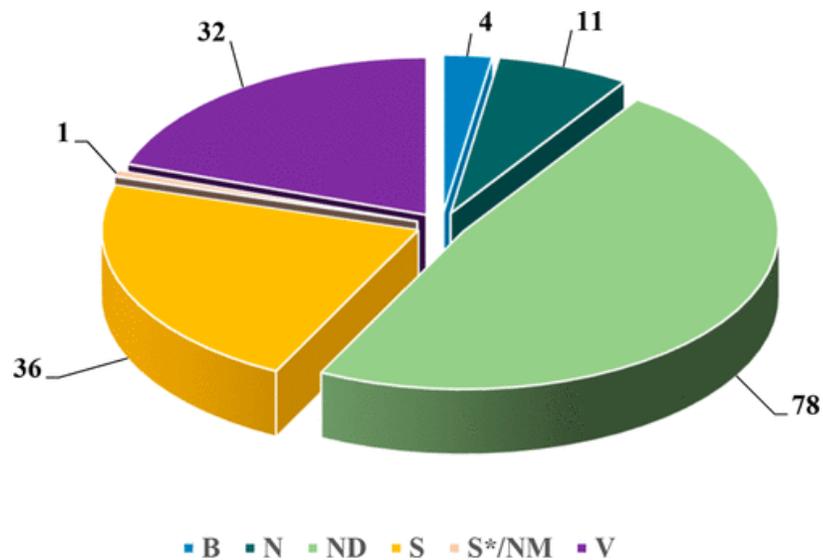
Farmaci provenienti da varie fonti



D. J. Newman, G. M. Cragg *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 770–803

- ▶ "B": biologico; un grande peptide o proteina
- ▶ "N": prodotto naturale
- ▶ "NB": Botanicals
- ▶ "ND" e "NM": derivato da un prodotto naturale e di solito è una modifica semisintetica
- ▶ "S": Droga totalmente sintetica, "S *": Sintetica, ma il farmacoforo è/era di un prodotto naturale
- ▶ "V": vaccino

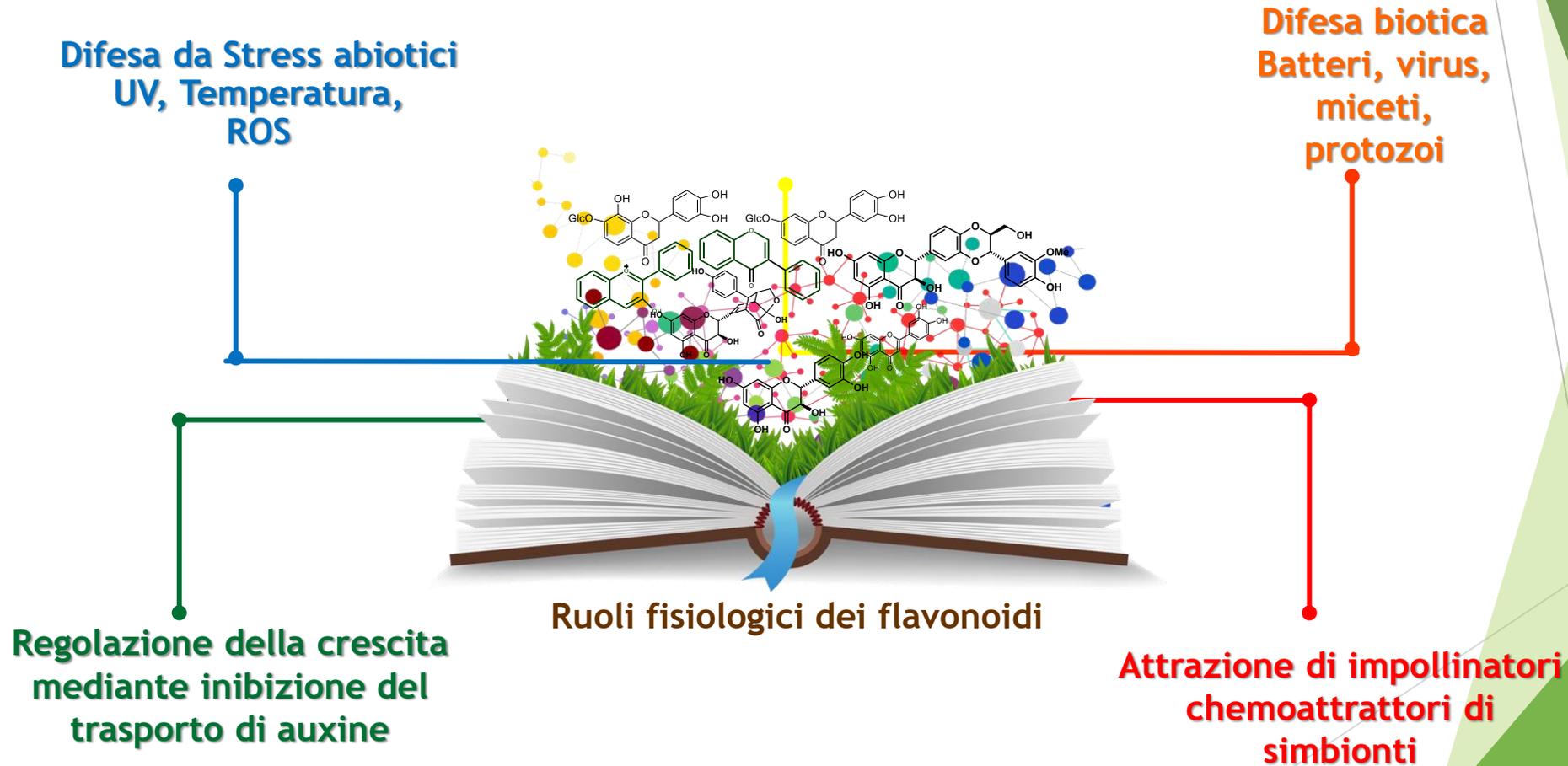
Antibacterial drugs by source.



- ▶ dei 162 agenti approvati sono farmaci biologici (4) o vaccini (32), prevalentemente come agenti profilattici.
- ▶ dei restanti 126 agenti, 78, ovvero poco più del 48% del totale, rientrano nelle categorie N o ND;
- ▶ 36 (22,2%) totalmente sintetico

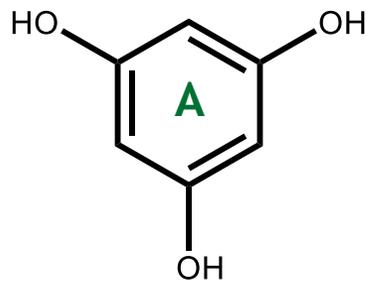
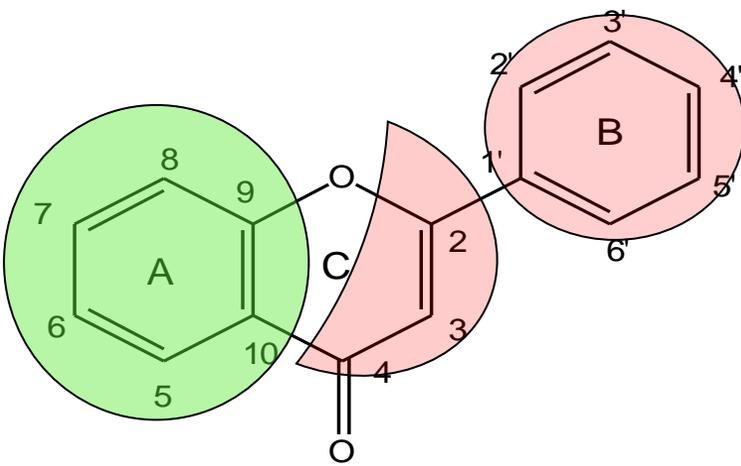
Flavonoidi

Appartengono a un'ampia classe di prodotti chimici che svolgono importanti funzioni nelle piante: combattere stress ambientali, attirare insetti che impollinano

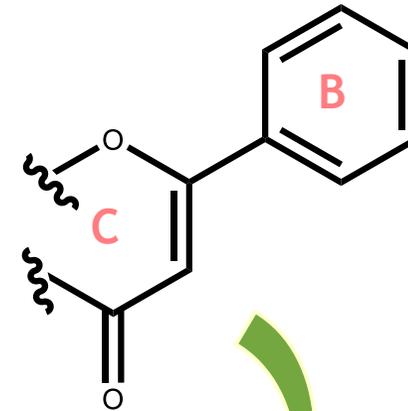


Struttura base dei Flavonoidi

L'**anello A** è formato da 3 unità di acetato
L'**anello B** con il ponte a 3 atomi di carbonio (γ -pirone) è costituito da una unità di fenilpropano (via dell'acido schichimico)

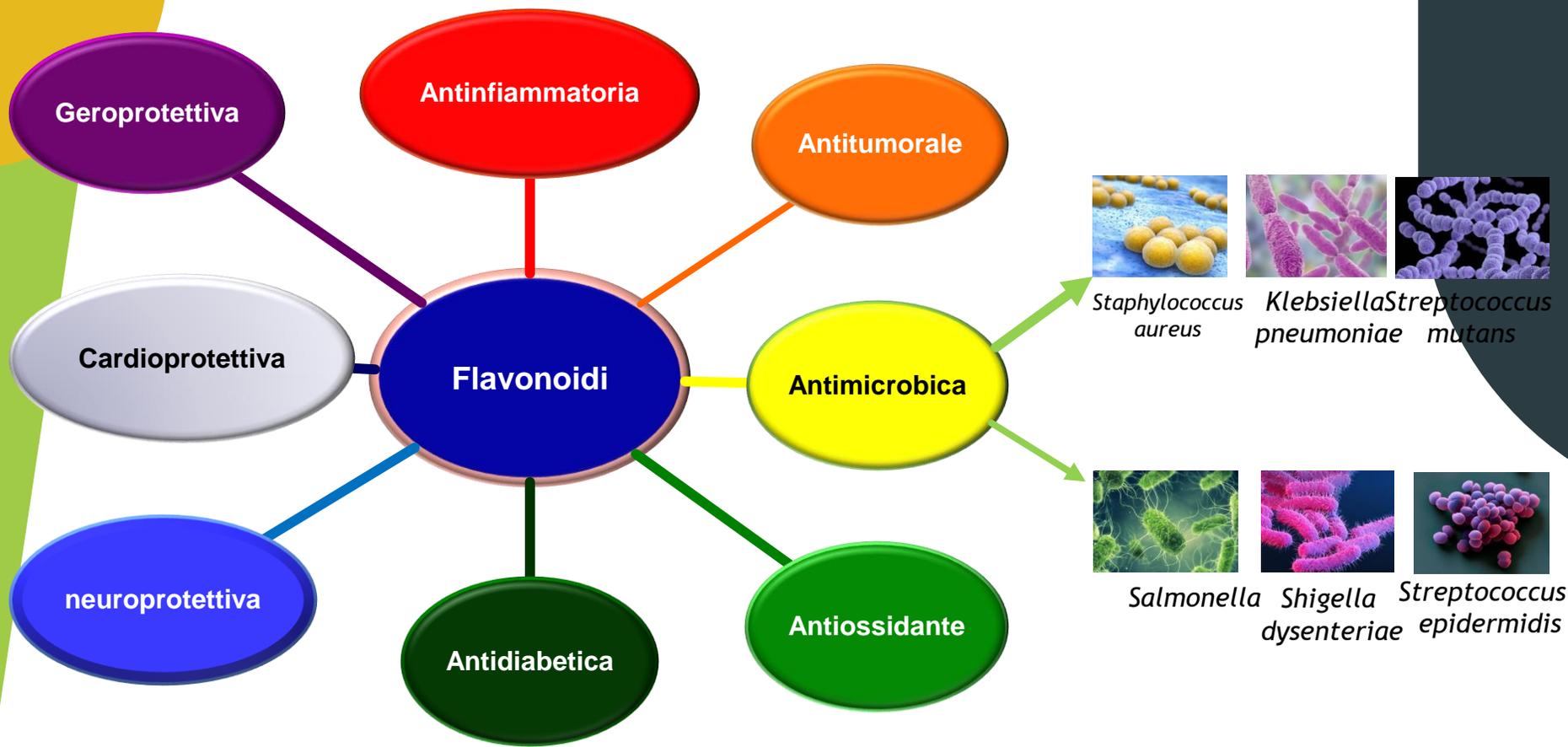


- **Anello A:** tre -OH in posizione *meta*, in alcuni derivati alchilati con prenilici, metili o glicosidati
- **Anello B:** funzione -OH in *para*, o in *para* e *meta* rispetto a catena C₃. Meno frequenti derivati con tre gruppi -OH o privi di -OH.



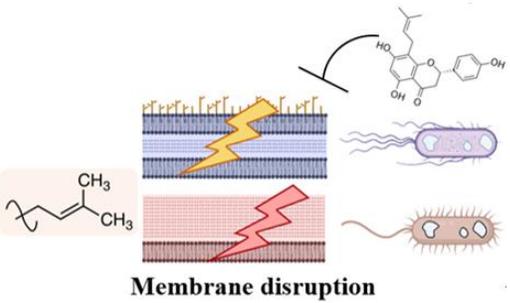
Sostituzione del nucleo Flavonoidico

Sostituenti regolano idrofilicità/ idrofobicità e modificano le caratteristiche steriche consentendo di ampliare la gamma dei target. Strutture idrofobiche interagiscono con la membrana, strutture idrofiliche interagiscono con diversi target proteici

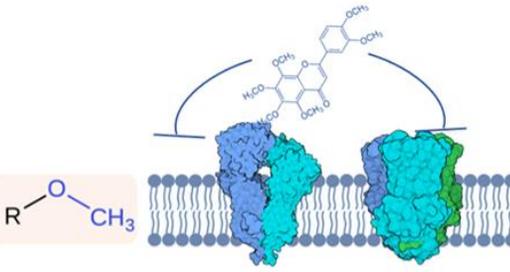


Attività biologiche

Attività antimicrobiche



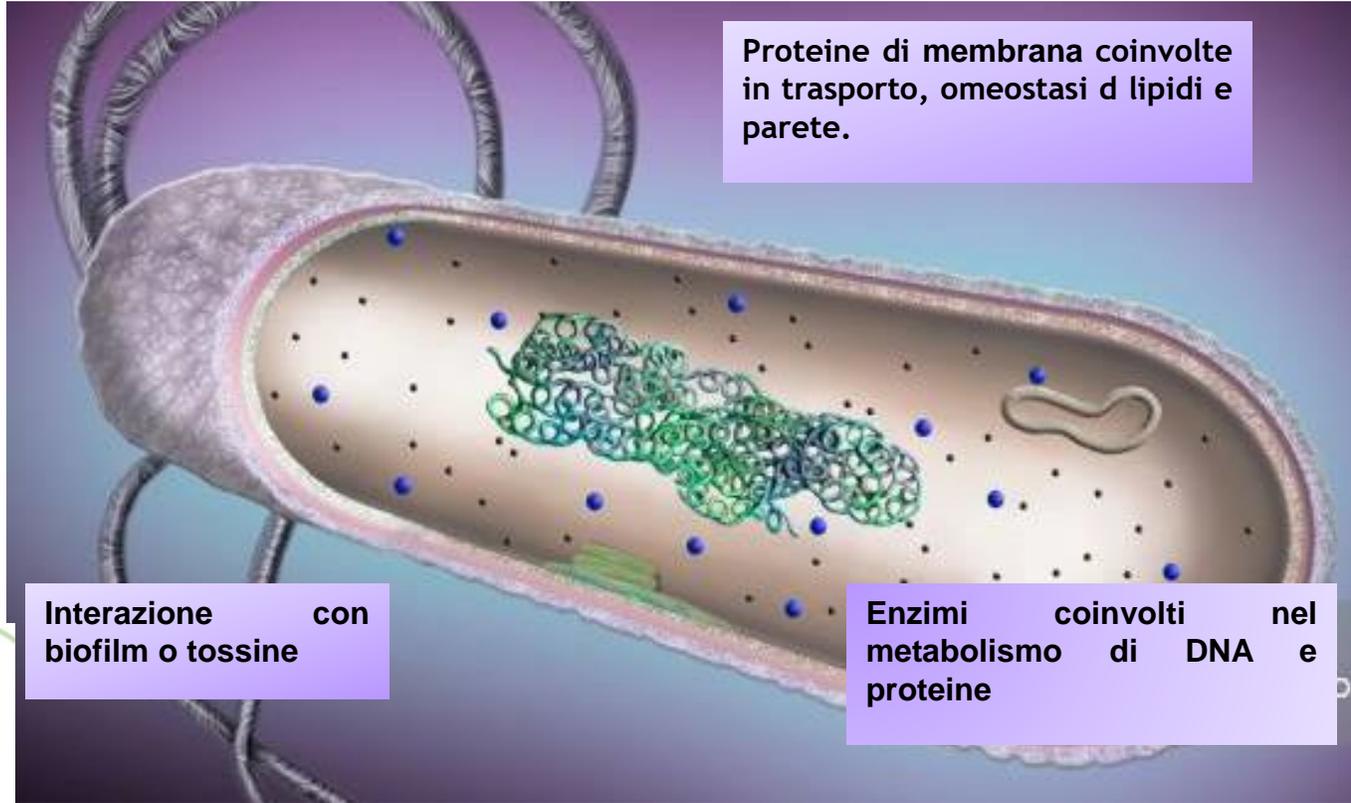
Membrane disruption



Efflux pumps inhibition



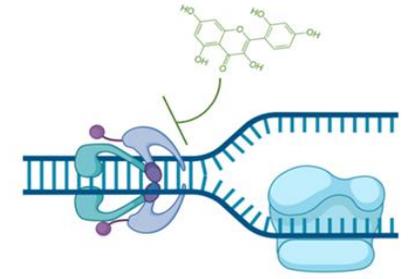
Anti-biofilm activity



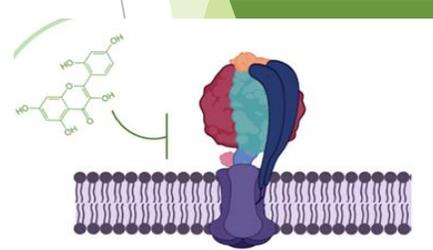
Proteine di membrana coinvolte in trasporto, omeostasi di lipidi e parete.

Interazione con biofilm o tossine

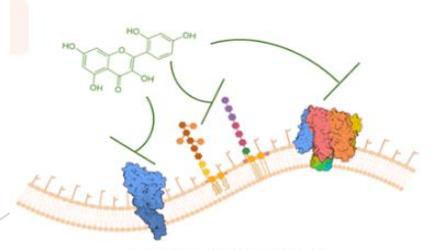
Enzimi coinvolti nel metabolismo di DNA e proteine



DNA gyrase inhibition

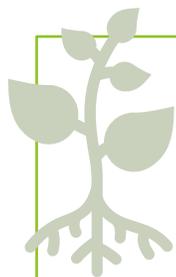


ATP-synthetase inhibition



Toxins inactivation

La Natura come fonte di farmaci



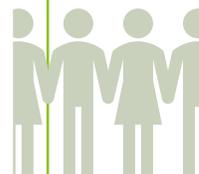
Il 90% dei prodotti per la salute è a base di piante



Il 50% dei farmaci di uso clinico è costituito prodotti di origine vegetale



Il 25% di questi farmaci è basato su molecole derivanti da piante superiori



Linee guida dell'OMS: oltre il 70% della popolazione mondiale fa ricorso alla medicina tradizionale per soddisfare i bisogni di salute primaria (Farnsworth, 1989)

Piante antibatteriche



Allium sativum (Aglione)



- ▶ L'aglio è una pianta bulbosa della famiglia Amaryllidaceae
- ▶ Il bulbo dell'aglio ha proprietà antibatteriche grazie alla presenza di allicina, un amminoacido contenente zolfo.



Allicina 200mg/cps-
Pacchetto antibiotico naturale

- ▶ E' fortemente antibatterica ed agisce tra gli altri organismi su *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium botulinum*, *Candida albicans*.

Arctium lappa (Bardana)



Braz. Dent J (2005) 16(3): 192-196

ISSN 0103-6440

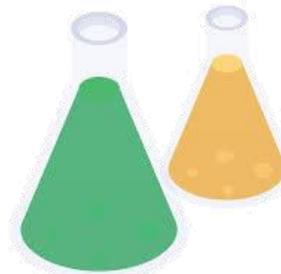
Antimicrobial Activity of *Arctium lappa* Constituents Against Microorganisms Commonly Found in Endodontic Infections

Juliana Vianna PEREIRA¹
Débora Cristina Baldoqui BERGAMO¹
José Odair PEREIRA²
Suzelei de Castro FRANÇA¹
Rosemeire Cristina Linhares Rodrigues PIETRO¹
Yara T. Corrêa SILVA-SOUSA¹

¹University of Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

► E' una pianta erbacea angiosperma dicotiledone, eretta e biennale, appartenente alla famiglia delle Asteraceae. Utilizzata nel trattamento delle infezioni endodontiche, acne.



Estratto

Grazie al suo potere batteriostatico su diversi batteri, ma in particolar modo sullo *Staphylococcus aureus*, viene usata nel trattamento dell'acne, (Inulina)



Tropaeolum majus (Nastruzio)



► E' una pianta della famiglia Tropaeolaceae, Le foglie e i fiori del nasturzio hanno proprietà antibiotiche dovute al loro contenuto di isocianato di benzile. Il nasturzio si è dimostrato efficace contro diversi batteri comuni. È usato sia esternamente che internamente, per la cura dei disturbi respiratori e delle vie urinarie..

THE EFFECT OF *TROPAEOLUM MAJUS* L. ON BACTERIAL INFECTIONS AND *IN VITRO* EFFICACY ON APOPTOSIS AND DNA LESIONS IN HYPEROSMOTIC STRESS

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Oradea, Oradea, Romania;

²Department of Physiology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania;

³Department of Preclinical Disciplines, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Oradea, Oradea, Romania



Origanum vulgare (Origano)



- E' una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Lamiaceae ed ampiamente utilizzata come spezia della famiglia L'origano può essere utilizzato sia in estratti acquosi e alcolici, sia sotto forma di olio essenziale. Utilizzata contro batteri, funghi e virus



Article

Antibacterial Activity of Oregano (*Origanum vulgare* L.) Essential Oil Vapors against Microbial Contaminants of Food-Contact Surfaces

Loris Pinto , Salvatore Cervellieri , Thomas Netti , Vincenzo Lippolis and Federico Baruzzi

Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy, Via G. Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy; loris.pinto@ispa.cnr.it (L.P.); salvatore.cervellieri@ispa.cnr.it (S.C.); th.netti97@gmail.com (T.N.); vincenzo.lippolis@ispa.cnr.it (V.L.)

* Correspondence: federico.baruzzi@ispa.cnr.it; Tel.: +39-080-592-9319



Il potere battericida degli Oli essenziali





Oli essenziali: COMPOSIZIONE

- 1) **GRUPPO dei TERPENOIDI:**
monoterpeni e sesquiterpeni
- 2) **Gruppo dei composti AROMATICI** derivati del
fenilpropano (C6-C3)

SONO POCO FREQUENTI; di una
certa importanza alcune ALDEIDI:

anetolo, apiolo, eugenolo..

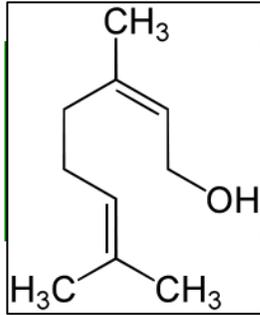
- 3) **Altri composti, generati dalla
DEGRADAZIONE di composti non
volatile**

da acidi grassi: perossidazione,
idrossilazione...

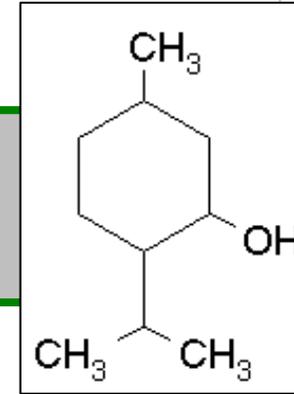


Terpeni

linaolo



mentolo



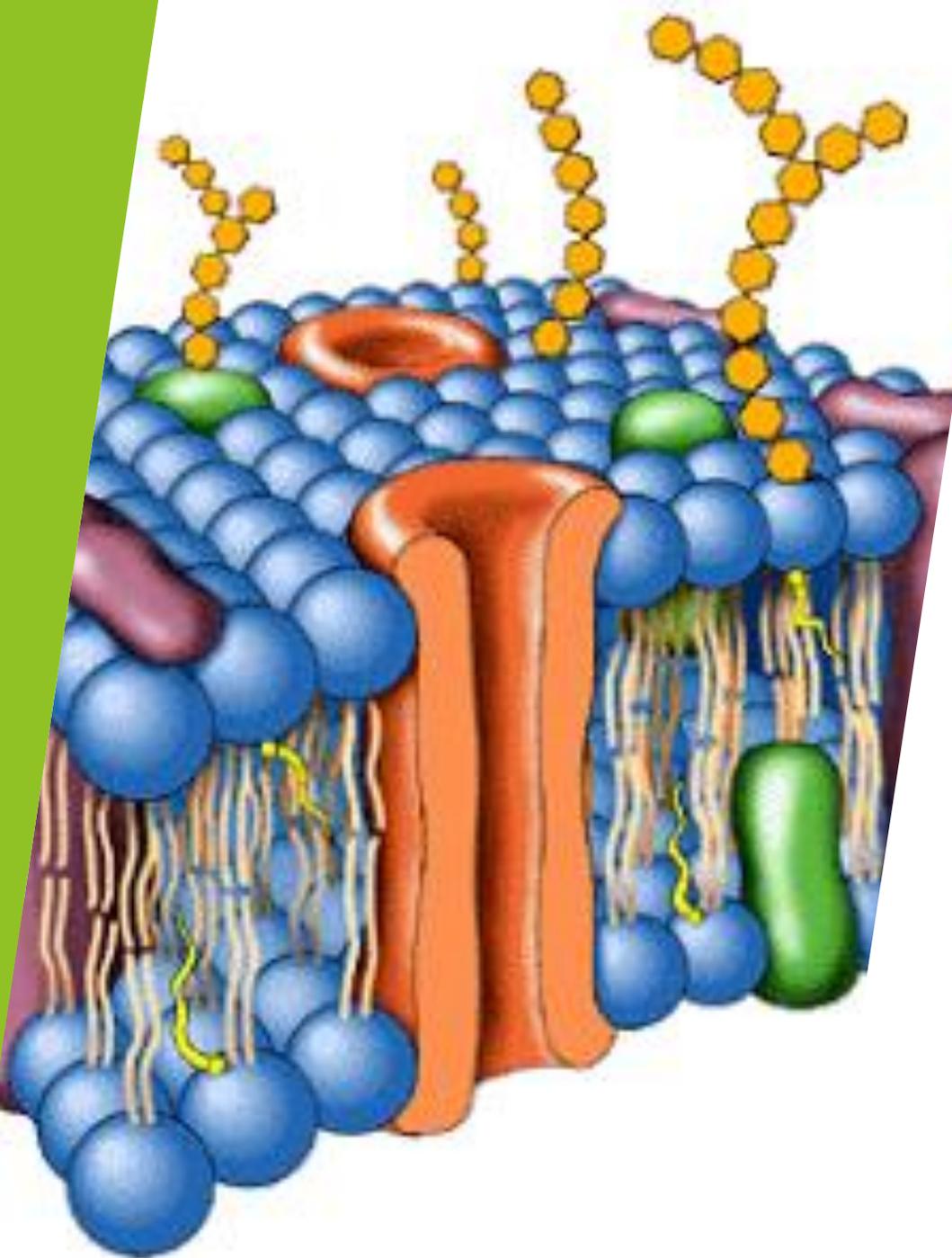
La **relazione struttura-attività** risulta evidente nel caso di molti componenti monoterpenei

● **scheletro idrocarburico**, ciclico: facilita l'assorbimento delle molecole da parte dei tessuti, per interazione dello strato fosfolipidico interno della membrana cellulare

● **funzione ossigenata**: determina, a seconda del principio attivo, effetti biologici sul funzionamento sia delle membrane che dei processi cellulari

Alte dosi: Effetto irritante per destabilizzazione delle membrane

Basse dosi: Effetti metabolici specifici



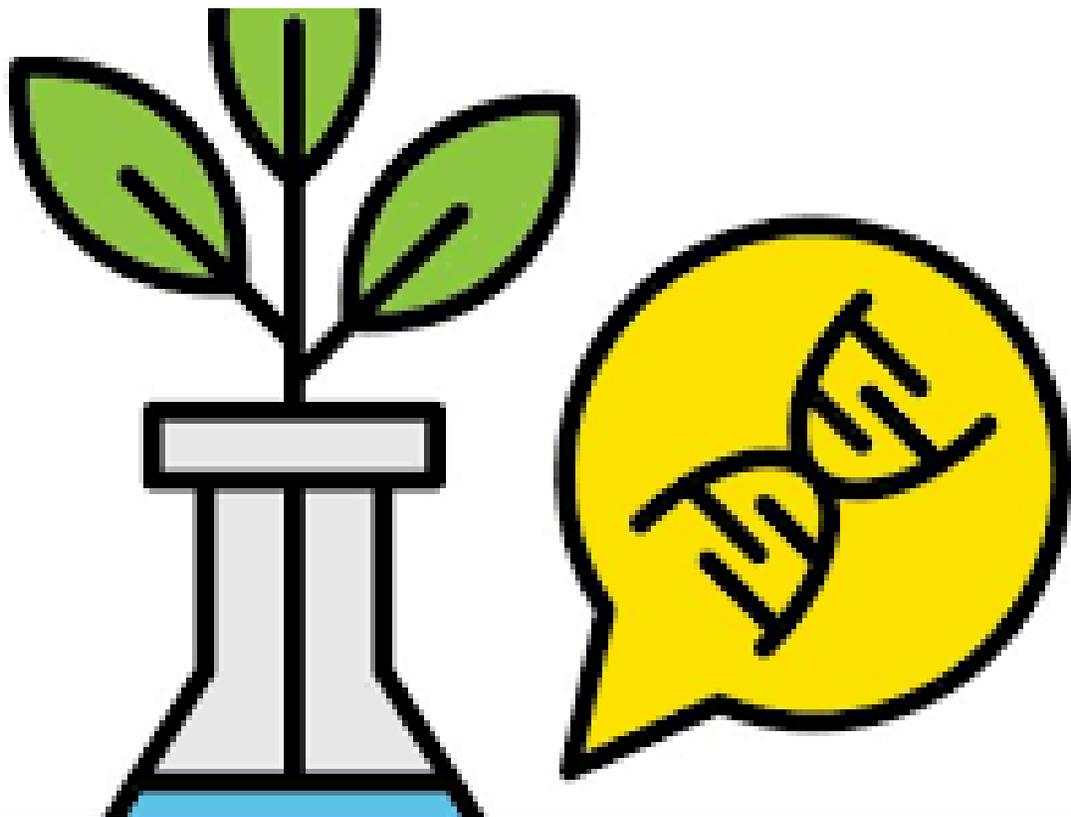
► Attività antibatterica

► L'attività antimicrobica degli oli essenziali è dovuta alla **interazione** del loro gruppo funzionale (essenzialmente il fenolo) con la **membrana**, interazione che causa deterioramento della membrana

L'idrofobicità consente all'o.e. di ripartirsi tra i lipidi della membrana cellulare batterica, alterando le strutture cellulari e rendendole così più permeabili.

Le perdite eccessive di ioni e molecole dalla cellula microbica conducono inevitabilmente alla morte.

Studio delle molecole naturali bioattive



Foeniculum vulgare Miller (Apiaceae)



Ordine: *Plantae*

Divisione: *Tracheophyta*

Classe: *Magnolipsida*

Ordine: *Apiales*

Famiglia: *Apiaceae*

Genere: *Foeniculum*

Specie: *vulgare*

Foeniculum vulgare Miller (*Apiaceae*)

Uso del *F. vulgare* in medicina tradizionale:

Carminativo

Diuretico

Protettore cardiovascolare

Protettore neuronale

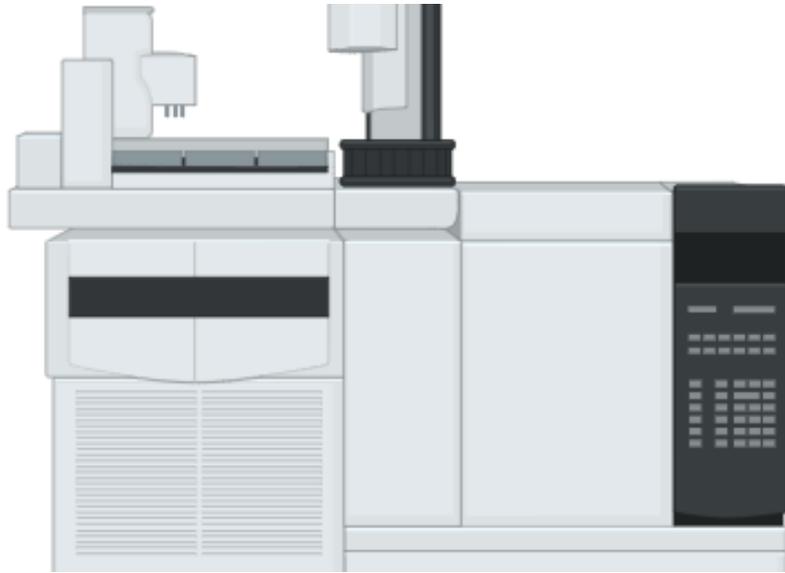


Scarto

Commercializzata

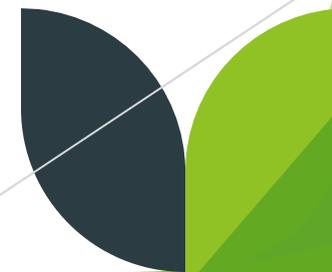


Estrazione
oli
essenziali

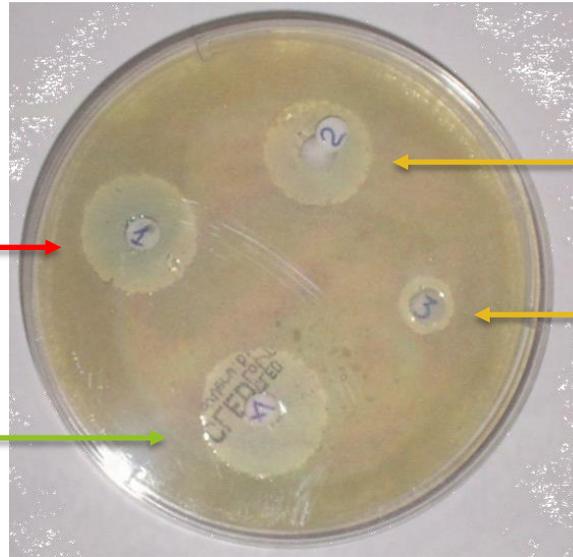


| | | |
|----------------------------|------|------|
| Total | 97,5 | 97,3 |
| Monoterpene hydrocarbons | 29,7 | 31,3 |
| Oxygenated monoterpenes | 66,6 | 64,8 |
| Sesquiterpene hydrocarbons | 1,0 | 0,5 |
| Oxygenated sesquiterpenes | 0,2 | 0,7 |

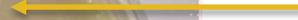
Caratterizzazione fitochimica: GC-MS



Scarto



Antibiotici



Commercializzata



| Microorganisms | Inhibition Diameter (mm) | | Ampicilline 20µg |
|-------------------------|--------------------------|----------------|------------------|
| | EO waste | EO edible part | |
| Escherichia coli | 6 | 6 | 15 |
| Staphylococcus aureus | 14 | 13 | 25 |
| Salmonella enterica | 13 | 12 | - |
| Shigella dysenteriae | 12 | 12 | 11 |
| Enterococcus faecalis | 13 | 12 | 20 |
| Acinetobacter baumannii | 12 | 11 | 16 |
| Lysteria monocitogenes | 12 | 11 | 13 |

Salvia officinalis L. (Lamiaceae), «pianta della salvezza»



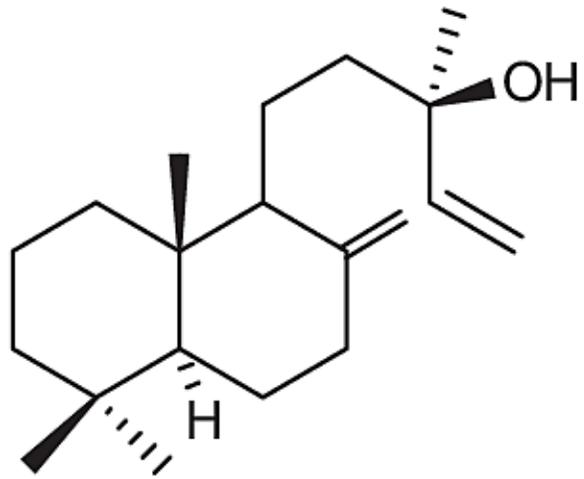
- ▶ *Salvia* deriva dalla parola latina “salvare” e significa “curare”; *officinalis* sottintende “medicamento”.
- ▶ Ampia gamma di attività farmacologiche

- ▶ Effetti antitumorali
- ▶ Antinfiammatori
- ▶ Anti-nocicettivi
- ▶ Antimicrobici
- ▶ Antimutageni
- ▶ Antidemenza
- ▶ Ipoglicemici



Salvia officinalis L. (Lamiaceae), «pianta della salvezza».

- ▶ Nelle radici e nelle foglie è stata identificata un'ampia gamma di costituenti: alcaloidi, carboidrati, acidi grassi, derivati glicosidici composti fenolici, steroidi, terpeni/terpenoidi e cere



Il manool

- Il manool (diterpene labdanico) è uno dei componenti più abbondanti degli estratti di Salvia. Costituisce le foglie e delle radici. Studi pregressi hanno evidenziato un'attività su diversi batteri, tra cui *Streptococcus mutans*

Patogeno umano ed agente eziologico della carie dentale: *Streptococcus mutans*



Batterio gram-positivo, a forma di cocco, anaerobio facoltativo.



Colonizzatore della placca dentale.

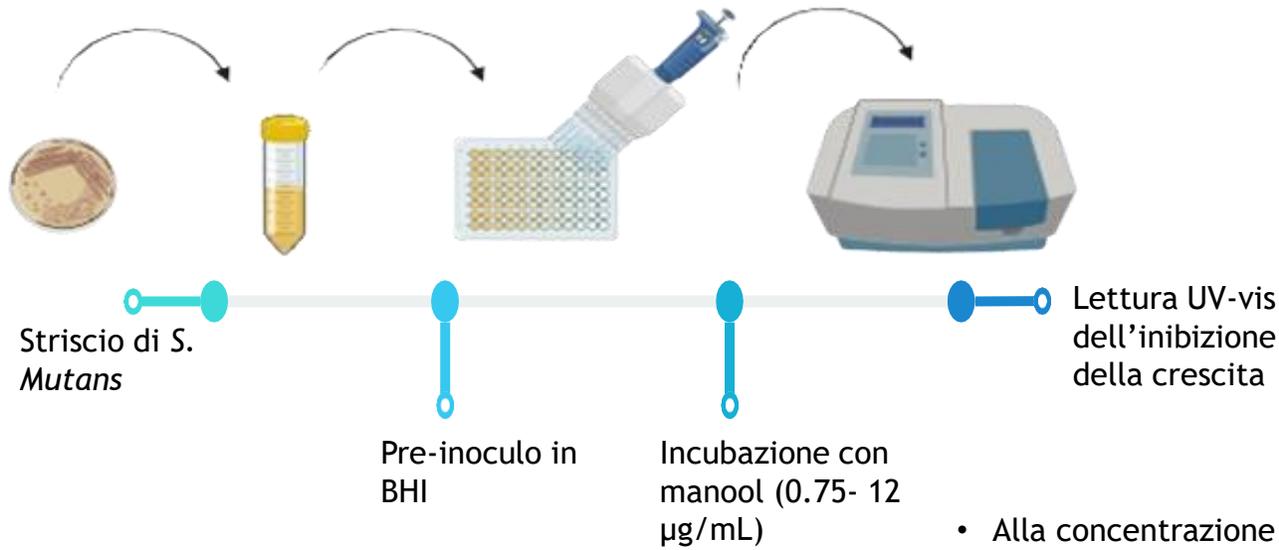


Principale agente eziologico della carie dentale.



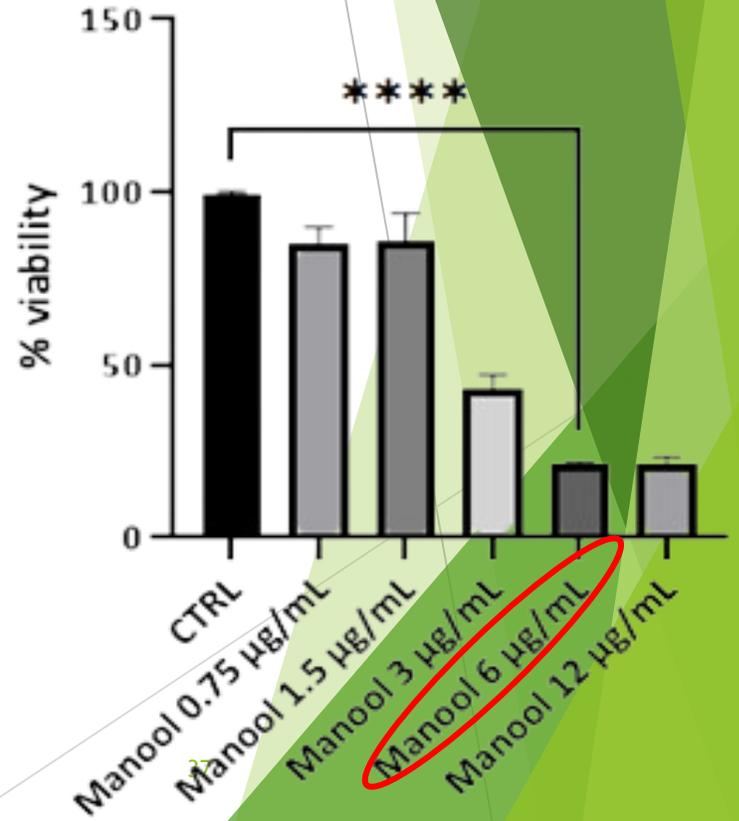
Associato anche ad infezioni extra orali come endocardite batterica, microemorragie cerebrali, nefropatia da IgA e aterosclerosi.

Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

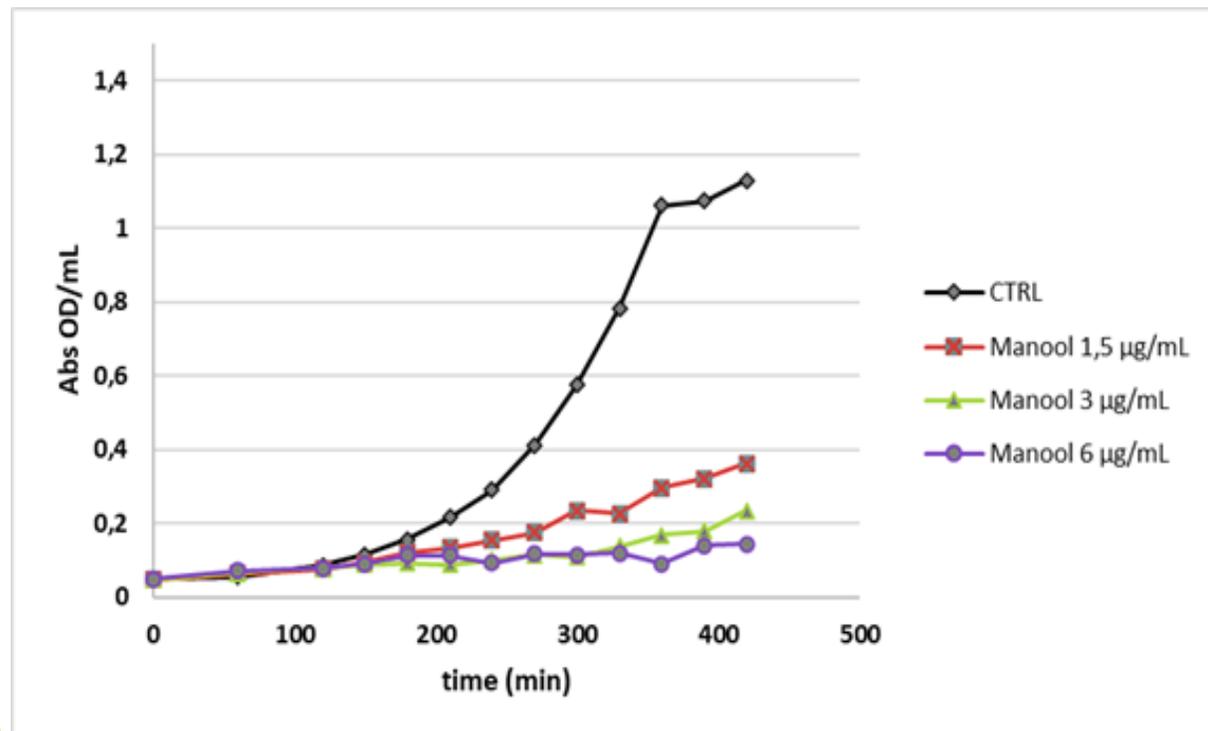


- Alla concentrazione di 3 µg/mL solo il 40% delle cellule sopravvive.
- 6 µg/mL è stata stimata come MIC₁₀₀

 Vitalità cellulare in seguito ad esposizioni con differenti concentrazioni di manool



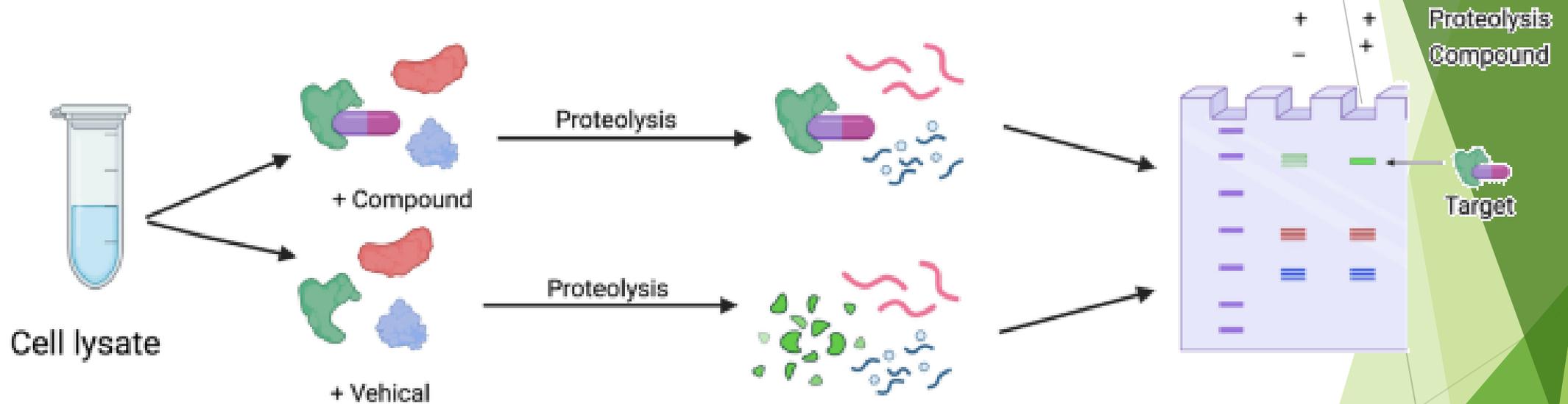
Valutazione della crescita di *S. mutans* in assenza e in presenza di manool



► Curve di crescita in presenza di concentrazioni crescenti di manool in aerobiosi, alla temperatura di 37 ° C.

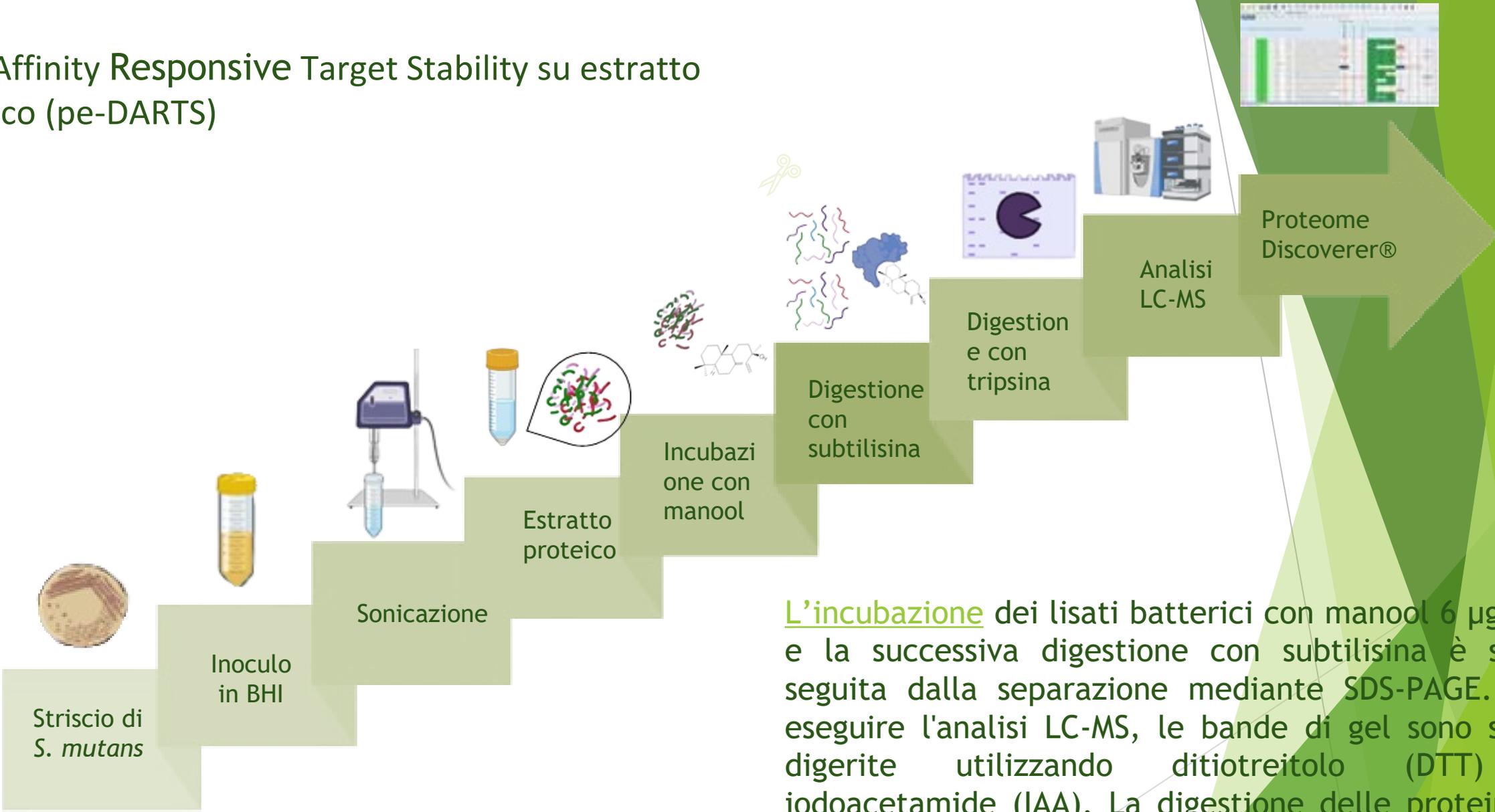
Drug Affinity Responsive Target Stability Assay (DARTS)

Approccio proteomico indiretto che consente di identificare il target(s) proteico di piccole molecole bioattive.



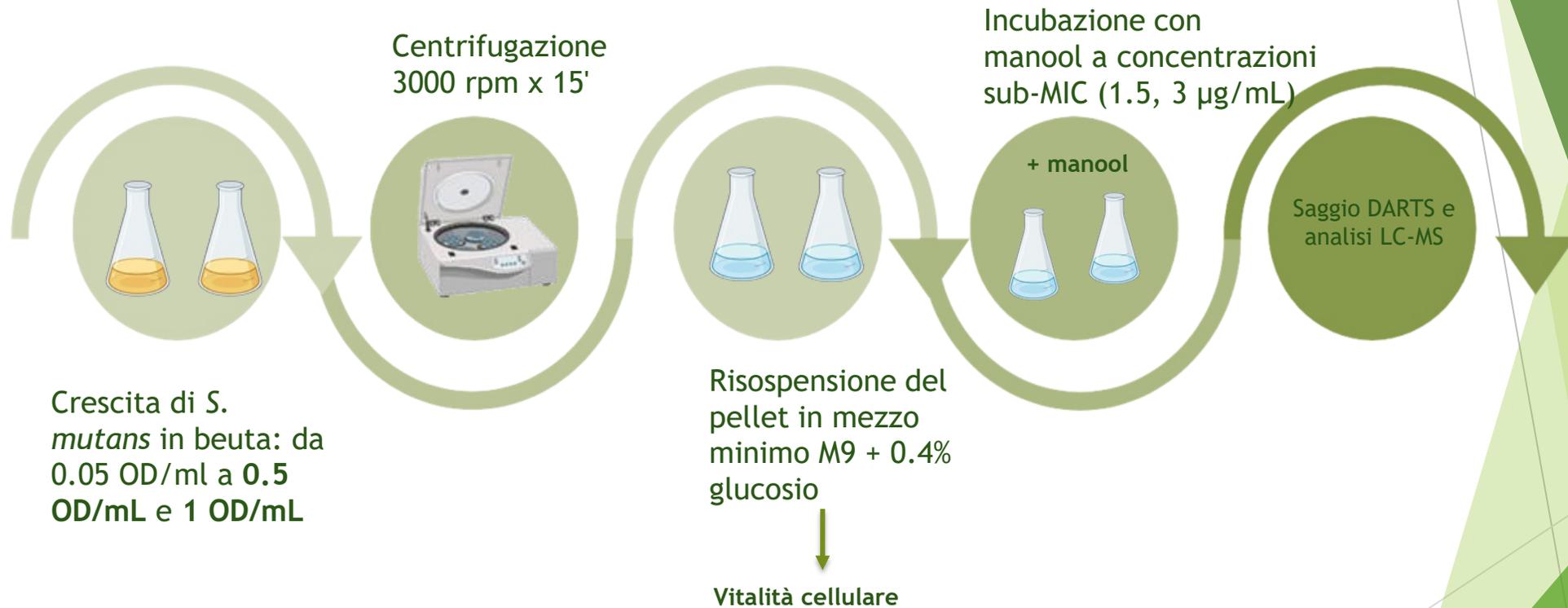
L'output finale sarà la presenza della/e proteina/e target non digerita nei soli campioni trattati con il composto a seguito dell'avvenuta interazione con la molecola.

Drug Affinity Responsive Target Stability su estratto proteico (pe-DARTS)



L'incubazione dei lisati batterici con manool 6 µg/mL e la successiva digestione con subtilisina è stata seguita dalla separazione mediante SDS-PAGE. Per eseguire l'analisi LC-MS, le bande di gel sono state digerite utilizzando ditiotreitolo (DTT) e iodoacetamide (IAA). La digestione delle proteine è stata effettuata con tripsina. L'identificazione delle proteine è stata ottenuta tramite il software Proteome Discoverer.

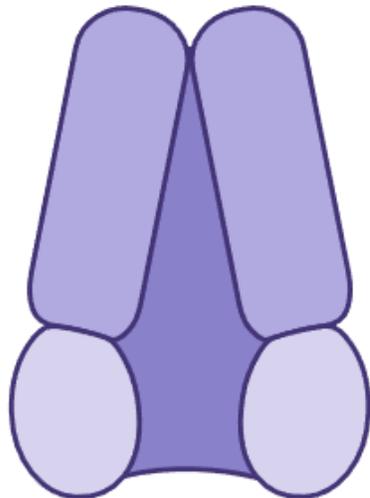
Drug Affinity Responsive Target Stability su cellule batteriche (bc-DARTS)



Famiglie proteiche identificate dagli esperimenti DARTS

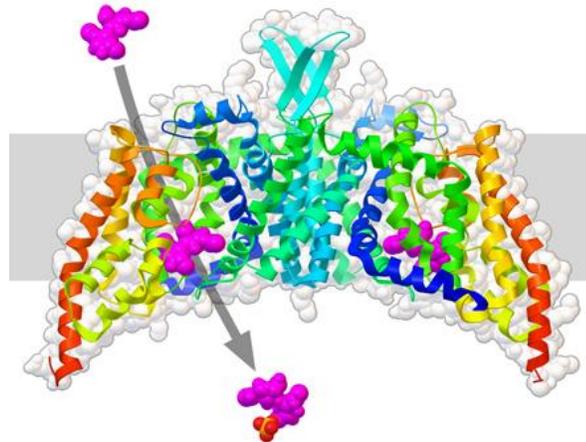
1

Superfamiglia ABC (ATP binding-cassette)



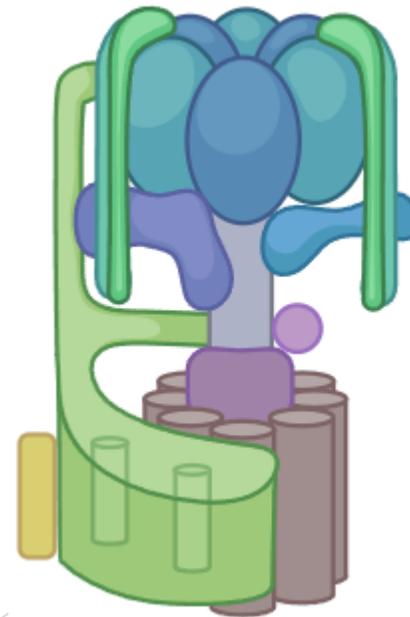
2

Famiglia PTS (phosphotransferase system)



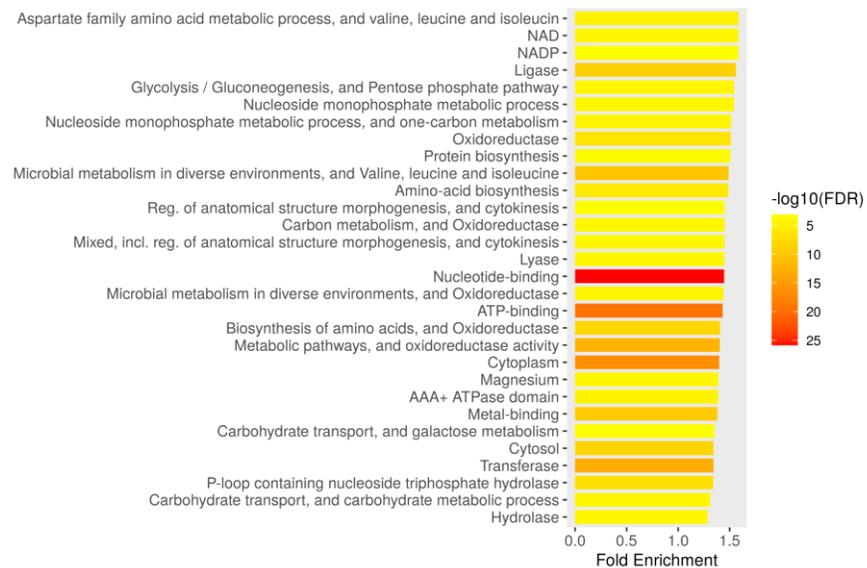
3

Famiglia ATP- sintasi

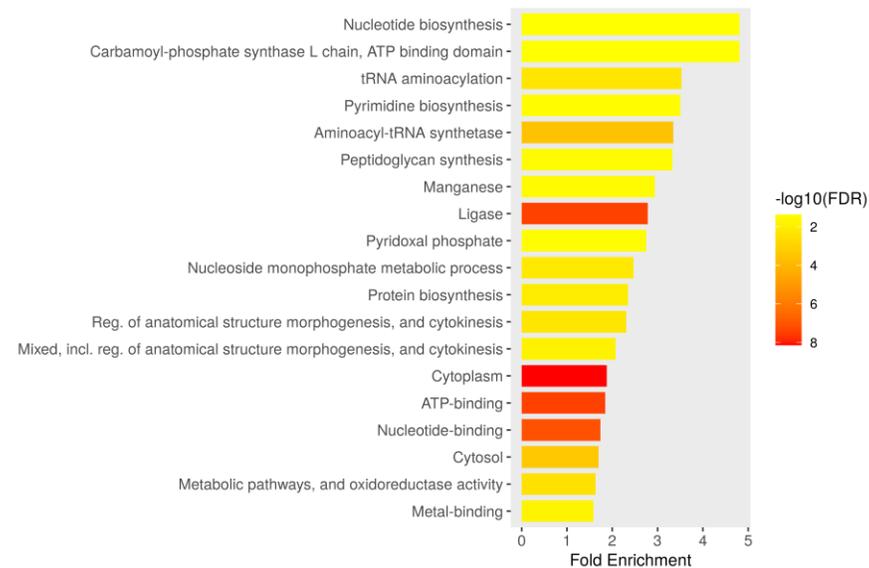


Metabolic pathway individuati

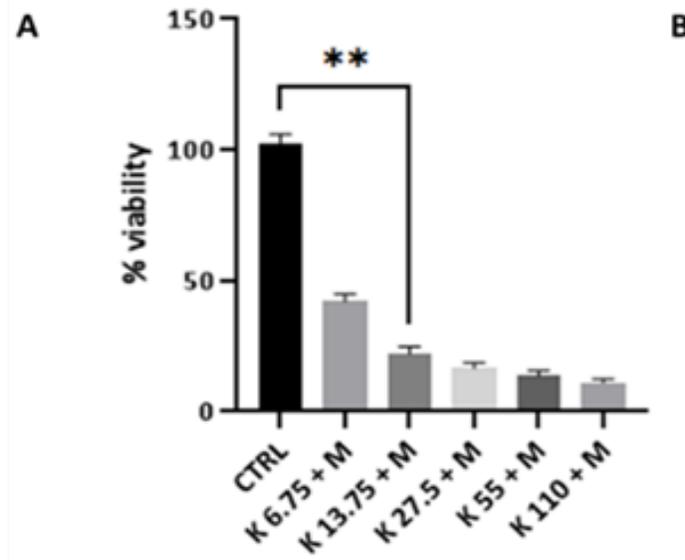
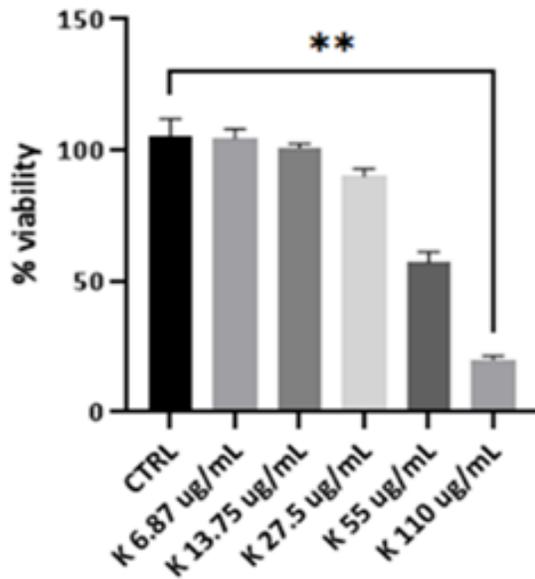
Proteomica *S.mutans*



Proteomica post-trattamento



Determinazione dell'attività del manool in combinazione con kanamicina



Indice della concentrazione inibitoria frazionata (FICI). I dati sono stati elaborati secondo i criteri descritti da Lewis: azione sinergica quando FICI è < 0,5, azione additiva quando $0,5 < FICI < 1$, azione indifferente quando FICI varia da 1 a 4 e azione antagonista quando $FICI > 4$.

| Molecola | MIC ₁₀₀ (da sola) µg/mL | MIC ₁₀₀ (in associazione) µg/mL | FICI |
|------------|------------------------------------|--|------|
| Kanamicina | 110 | 13.75 | 0.62 |
| Manool | 6 | 3 | |

Minima concentrazione inibente (MIC) di kanamicina (K) su *S. mutans* da sola (A) e in associazione con manool (M) 3 µg/mL (B).

Inibizione formazione del Biofilm

24 $\mu\text{g}/\text{mL}$

12 $\mu\text{g}/\text{mL}$

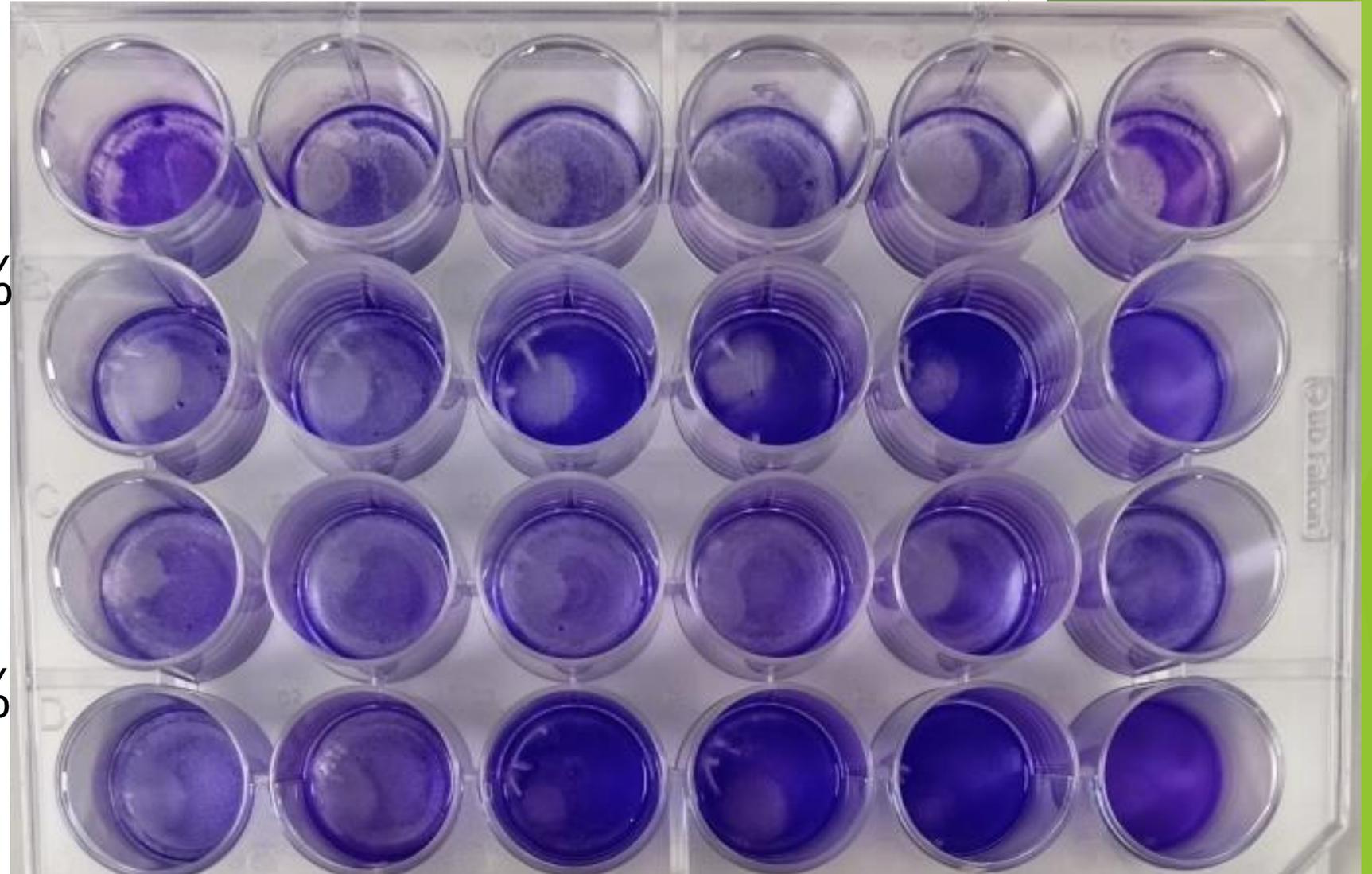
6 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Saccarosio 1%

Saccarosio 2%



Il team al completo



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI SALERNO



Nunziatina De Tommasi
Professore Ordinario



Fabrizio Dal Piaz
Professore associato



Valentina Parisi
Post-doc



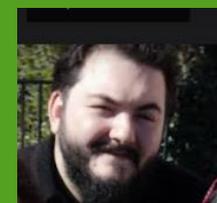
Raffaella Nocera
PhD student



Shiva Pouramin Arabi
PhD student



Zahra Alizadeh
PhD student



Emanuele Rosa
Assegnista di ricerca

The image features a white background with abstract geometric shapes in shades of green and dark blue. In the top left, there is a yellow circle partially cut off by the edge. To its right, a large dark blue leaf-like shape overlaps with a bright green leaf-like shape. The bottom of the image is a solid green horizontal band. On the left side of this band, there is a dark blue circle. On the right side, there is a rounded green shape. The word "Grazie" is centered in the white area in a green, sans-serif font.

Grazie